

## ファゴサイトーシスと膜電位変化 —電位依存性プロトンチャネルの役割と分子実体—

### はじめに

神経の興奮や筋収縮など細胞の膜電位変化を示す生命現象は、19世紀のガルバニの生体電気の研究に始まって今日に至るまで生理学の重要なテーマとして研究されてきた。しかし、膜電位変化はこれに留まらず神経や筋以外の細胞でも見られる。特に、マクロファージや好中球など特殊な食機能をもつ細胞では、異物を貪食する際に細胞膜の脱分極変化を起こすことが知られており、近年そのメカニズムと役割が研究されてきた。本稿では、食細胞機能での膜電位変化についてこれまでの知見を概略し、電位依存性プロトンチャネル活性を示す新たな膜分子について紹介する。

### 1. 食機能と活性酸素

感染防御の最前線であるマクロファージや好中球などの食細胞では、病原菌などを貪食する際に、大量の酸素を消費して (respiratory burst) 急激な活性酸素の産生を起こす。活性酸素があくまで呼吸鎖の中間段階の産物であり最終的に水が産生されるミトコンドリアの場合とは異なり、貪食細胞では NADPH を使って酸素に電子が供与されて  $O_2^-$  が作られ、これが殺菌の現場である細胞外や、バクテリアなどの異物を囲む細胞内膜 (ファゴソーム) に出される (図 1)。これらは複数の化学的過程 (オキシダーゼ活性、イオンの移動、活性酸素の遷移、酵素の活性化、pH 変化) と物理的な変化 (膜電位、浸透圧、容積変化など) が組み合わさって起こる複合的過程であり全貌はまだ完全には解明されていないが、活性酸素の流れとしては、NADPH オキシダーゼによって産生された  $O_2^-$  が、すぐに  $H_2O_2$  に変換され、更にプロトンとともにミエロペルオキシダーゼ (MPO) の基質となって次亜塩素酸に変換される<sup>1)</sup>。最初のステップである  $O_2^-$  の生成は、NADPH を基質とする複数のサブユニットの複合体からなるオキシダーゼ (NADPH オキシダーゼ) の作用による。NADPH オキシダーゼが欠損または変異した患者では、真菌などの感染に抵抗性が無くなり、自然免疫不全により感染を繰り返す慢性肉芽腫症となる。食細胞により異物が細胞表面の受容体により認識

されると、プロテインキナーゼ C (PKC) および低分子量 G タンパク質である Rac のシグナルを介して活性をもつ NADPH オキシダーゼタンパク質複合体が膜に形成され、急激な活性酸素の産生が起こる。このシグナル伝達の活性化過程については国内外で詳細な解析が行われており、優れた日本語の総説があるので参照されたい<sup>2,3)</sup>。

### 2. 食機能と細胞膜電位と $H^+$ の移動

貪食細胞ではオキシダーゼの作用により、電子一つが酸素 1 分子に受け渡されると、細胞内外での電荷の中性が崩れて細胞内にプラスの電荷が貯まるため、細胞膜が大きな脱分極を起こす。Henderson らは、好中球の細胞膜を用いて  $O_2^-$  の産生に伴う膜電位の脱分極現象を定量的に解析したところ、脱分極の程度が細胞内外の pH によって変化し、NADPH オキシダーゼの作用に伴いプロトンが移動することを見出した。彼らは細胞内小器官をすべて除いたサイトプラストという細胞膜のみから成る膜系を用いており、このプロトンの移動は ATP に依存するプロトンポンプでは説明できず、それ以外のプロトンの移動経路が存在することが示された<sup>4)</sup>。

その後、血球細胞からの電気生理学的記録により、実際にプロトンの移動が直接イオン電流として計測され、細胞内外の pH 変化と膜電位変化の両方により活性化されるプロトン電流の存在が明らかになった (電位依存性プロトン電流を以下 Hv 電流と略す)。Hv 電流は、軟体動物のニューロンから最初に記載され、その名の通り、脱分極により活性化される  $H^+$  に選択的なイオンチャネル電流である。その後マクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球、ミクログリアなどで電気生理学的に詳しく記載され、以下の性質が明らかにされてきた。

- (1) プロトン選択的にイオンを透過させる。
- (2) 脱分極により活性化される。
- (3) 細胞内外の pH 差により活性化の膜電位閾値がシフトする。
- (4) マイクロモル程度の亜鉛イオンで活性が抑制される。

この中で (3) の特性は、この Hv 電流の生理機能を考える上で、大変重要である (図 3A)。イオンチャネルの場合、ポンプやトランスポーターとは異なり、膜電位とイオン濃度勾配 (プロトンの場合は細胞内外の pH 差) のバランスでプロトンが流れる向きが決まるが、(3) の性質故に、プロトンを外向きに流すような「膜電位+プロトンの濃度差」状況の時だけイオンが通るようになる。これによってあたかもプロトンポンプのように常に一方向性にプ

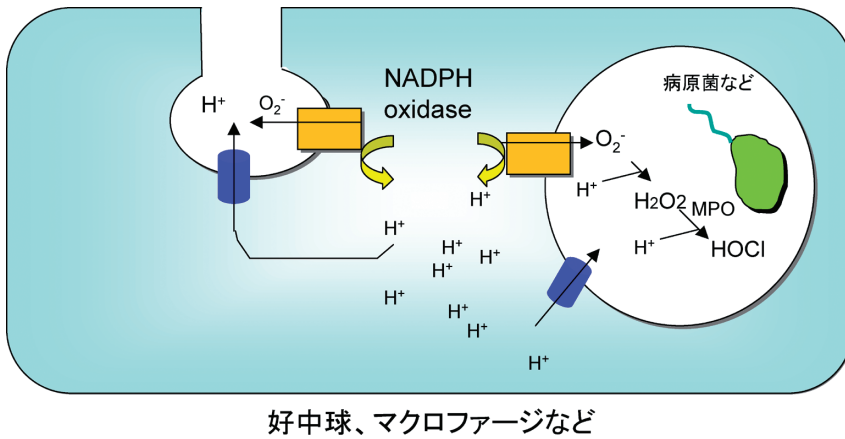
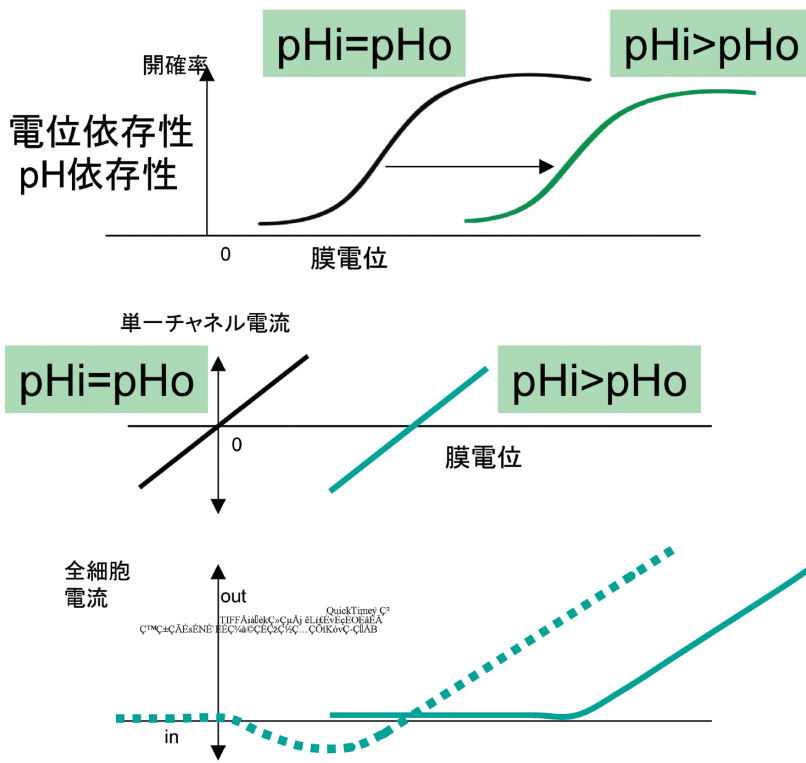
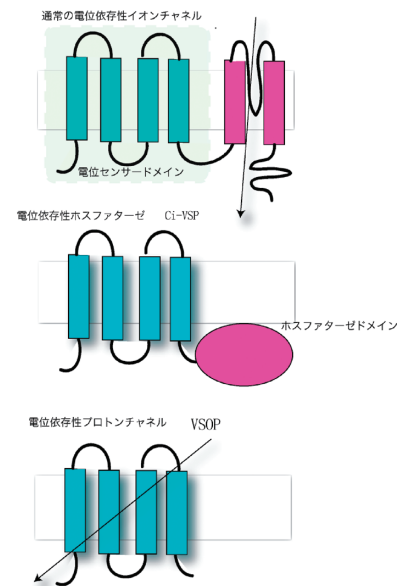


図1 貪食細胞における活性酸素産生と電位依存性プロトンチャネルの役割  
青：電位依存性プロトンチャネル，黄：NADPH オキシダーゼ

A



B



C

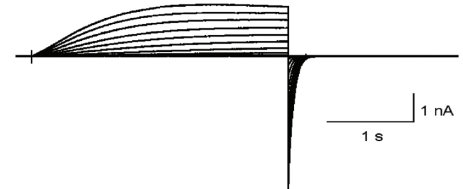


図3 A. 電位依存性プロトンチャネルは脱分極により活性化されるが、その特性（コンダクタンス-電圧関係）は透過するイオン自身であるプロトンの細胞内外の濃度差，つまり pH の差により規定される。たとえば細胞外 pH ( $pH_o$ ) が細胞内 pH ( $pH_i$ ) より低い場合には，コンダクタンス-電圧関係は右側（プラス側）に移動して，プロトン濃度差と膜電位差で決定されるプロトン流を駆動する電気化学的な力が内向き（細胞内へ流れ込む向き）になる。このような膜電位のときにはチャネルが開かず電流は流れない。常にプロトンの流れる向きが外向きのときにチャネルが開き一方方向性にプロトンを通す。2段目の単一チャネル電流は，多くのイオンチャネルで直線上の電流電圧関係を示すことから推定したものである（電位依存性プロトンチャネルは単一チャネル電流が小さく計測が困難であるため，実験的には，ここで示したような単一プロトンチャネルの直線的な電流電圧曲線は証明されていないが，概念をわかりやすくするために便宜的に記載してある）。B. 電位センサードメインタンパク質の種類。通常の電位依存性チャネルは電位センサードメインとイオンを透過させるポアドメインを通す。電位依存性ホスファターゼはポアドメインの代わりにホスファターゼドメインを有する。VSOPは電位センサードメインだけから成る。C. VSOPを発現系細胞である tsA201 細胞に強制発現させたときに膜電位固定下で見られる電流。脱分極パルスを様々なレベルに与えたときの電流を重ね書きしてある。

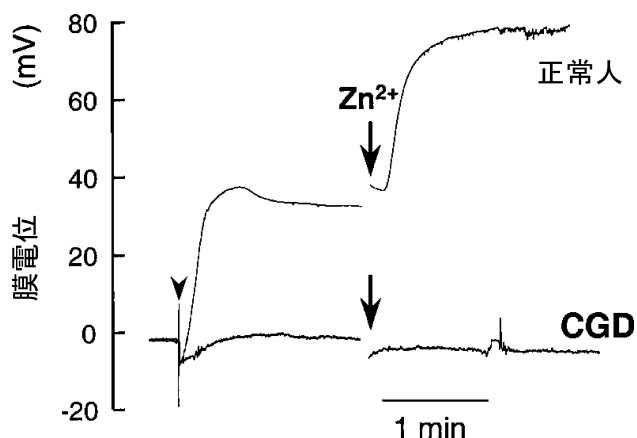


図2 好酸球を用いパッチクランプ法により膜電位変化を記録した例 (文献6より)

矢頭：ギガオームシール (パッチピペットが細胞膜にシールした) 形成のあとで細胞膜が破れ、ホールセルモードになって細胞内還流が開始されたタイミングを示す。正常人の好酸球では脱分極が起こるが NADPH オキシダーゼ欠損の患者 (CGD) では脱分極が起こらない。また正常人では亜鉛イオンを投与すると (矢印) 更に脱分極が大きくなる。

ロトンを通す経路として働くことが可能である (図3A)<sup>5)</sup>。

その後も、血液細胞の Hv 電流はオキシダーゼ機能との関係で詳細に解析された。スイスのグループは膜電位変化をパッチクランプ法により計測し、GTP $\gamma$ -S により活性酸素産生を活性化させると大きく細胞膜の脱分極が起こるが、亜鉛イオンで Hv 電流の活性を阻害するとこの脱分極の程度が更に大きくなるという現象を記載した (図2)<sup>6)</sup>。つまり、Hv 電流は、神経細胞のカリウムチャネルのように膜電位についてセルフフィードバックの機構をもち、脱分極により活性化して細胞内のプロトンを排出することで膜電位を脱分極しすぎないようにしていると考えられる。更に Demaurex らは単一の血球細胞から Hv 電流活性と活性酸素活性を電気生理学的に同時に計測する実験系を確立し、オキシダーゼ活性と Hv 電流活性が並行して変動する現象を見出した。また DeCoursey らも同様な実験を行い、亜鉛イオンで Hv 電流を抑制すると膜電位が脱分極しすぎて本来膜電位依存的である NADPH オキシダーゼ活性が有意に抑制されることも明らかにした<sup>7)</sup>。

このように Hv 電流の重要性が認識されるに従い、その分子実体の同定が次の課題となっていく。まず、NADPH オキシダーゼ活性とプロトン輸送活性が平行して変動するという実験事実と、電子の輸送とプロトンの輸送を同時に行うことができるミトコンドリアのシトクロム c オキシダーゼからの類推から、gp91phox 自体の膜貫通ド

メインがプロトン輸送を担っている可能性が検討された。いくつかの実験証拠がこの説を支持した。①強制発現系に gp91phox (=NOX2) そのもの、またはその関連分子である NOX1 の truncated form (NOX1-gamma) を強制発現させると、Hv 電流が増加する、②内在性のオキシダーゼ活性はヒスチジンに結合する DEPC により抑制されるが、同時に Hv チャネル電流も抑制される。gp91phox の膜貫通領域のヒスチジンを変異させると、この強制発現による Hv 電流の性質が変化し、さらに DEPC 感受性が見られない、③細胞株である HL-60 細胞が好中球に分化する際に、オキシダーゼ活性と Hv 電流活性が平行して上昇してくる、④Hv 電流は、NADPH オキシダーゼと同様なアゴニストにより活性化される、などの知見である。しかし、これに対して、①オキシダーゼ活性と Hv チャネル活性は、完全には相関しない、②オキシダーゼ活性と Hv 電流は、阻害剤に対して異なる感受性を示す場合がある、③当初強制発現させると Hv 電流を増加させるといわれた NOX1-gamma は実際には RNA として存在せず、cDNA クローニングのアーチファクトである、などの否定的な反論が出された<sup>8)</sup>。更に、gp91phox 活性をほとんど示さない慢性肉芽腫症 (CGD) の患者や gp91phox のノックアウトマウスの血球細胞でもかなりの量のプロトンチャネル電流が残っていることや、gp91phox を含む NADPH オキシダーゼのサブユニットすべてを発現系細胞に強制発現させた再構成実験でオキシダーゼ活性は再現されるものの Hv 電流活性は見られないことから、「gp91phox または関連分子=電位依存性プロトンチャネル」説は十分な確証が得られず、電位依存性プロトンチャネルを形成する分子実体がほかに存在する可能性が指摘されていた。

### 3. 電位センサードメインタンパク質 VSOP の発見

我々の研究室では、脊椎動物の祖先と類縁の深い動物であるホヤのゲノム情報から、偶然にも既知の電位依存性チャネルに見られる電位センサードメインと酵素の両方を併せもつハイブリッド型分子である Ci-VSP を発見した<sup>9)</sup> (図3B)。電位センサードメインは、Na, Ca, K チャネルなどの電位依存性イオンチャネルに固有の分子構造で、膜電位差を感知して C 末端側にあるポアドメインの開口を制御する。Ci-VSP の電位センサードメインは、電位依存性チャネルと同様に膜電位を感知して、イオンの透過ではなく酵素活性の調節を行う<sup>9)</sup> (図3B)。さらに、電位センサードメインをもつ新たなタンパク質を検索し、ポアドメインも酵素ドメインももたない新たなタンパク質 VSOP

(=voltage-sensor only protein)を見出した(図3B,C)。VSPや通常の電位依存性チャンネルの場合と同様に電位センサーの構造変化に由来するダイポールの動きを電気生理学的に検討したところ、このゲート電流は観察されず、意外なことに大きなイオン電流が観察された(図3C)。様々に溶液のイオン組成を変化させて計測した結果この電流はプロトン電流でありこれまで血液細胞で記載されてきたHv電流の性質をほぼ完全に備えていることがわかった<sup>10)</sup>。マクロファージや脾臓の細胞など血液系に著明に発現していることとも合わせて、VSOPは長い間探し求められてきた電位依存性プロトンチャンネルの主要構成成分であると結論した。gp91phoxやHox1-gammaを強制発現させたときの場合に比較し電流量は数十倍以上大きいこと、アミノ酸置換によりチャンネル特性が大きく変化すること、異なる動物種由来のVSOPを強制発現させたときの電流特性が大きく異なることなどから、VSOPはチャンネル本体である可能性が十分高いと考えられる。当然ながら、ポアがないのにどうやってプロトンを透過させるのかという疑問が生じるが、プロトンの輸送は多くのタンパク質の例で、水素結合の鎖をバケツリレーのように組みかえる方式の移動が知られていることから、親水性のポア構造を必要とせず、既知のイオンチャンネルとは異なる仕組みでイオンを通してのではないかと考えている。プロトンの透過機構や膜電位感知の仕組みは、膜タンパク質の構造と機能の面で興味深い問題であり、今後人工膜への再構成実験などによる解明が期待される。

#### 4. 今後の問題

今回貪食細胞に発現する電位依存性プロトンチャンネルの最有力候補分子が同定されたことで、今後貪食細胞における膜電位やpHの意義を遺伝子レベルで解析する大きな糸口が得られたと言えるだろう。VSOPのノックアウトマウスなどを用いて、個体レベルでの感染への抵抗性を解析することにより、免疫細胞での膜電位シグナルやプロトンシグナルの意義が明らかにできると期待される。今後分子機能と生体機能の理解を繋げていくには、以下の点を考えて研究を進める必要があるだろう。

電位依存性プロトンチャンネルは複数のメカニズムを介して細胞機構に関わっている可能性がある。当初Hendersonらの研究により電位依存性プロトンチャンネルは好中球の細胞膜に記載され<sup>4)</sup>、細胞膜電位と細胞内pHの制御に関わる役者として研究されてきた。しかし、多くの研究から、プロトンチャンネルは細胞膜から離れた状態のファゴソーム

膜にも存在すると考えられており、ファゴソームの膜電位変化やファゴソーム内のpHの調節にも関与する可能性がある。とくにファゴソーム内のプロトン濃度の動態は、複数の活性酸素が形成される過程の基質となり、また浸透圧の変化とpHの制御を通してプロテアーゼの活性化に重要な因子である。複数の病原菌では、ファゴソームのpHの制御が不全になるために消化されずにマクロファージ内に留まり、病態の進行に繋がるということが知られている。電位依存性プロトンチャンネルがファゴソーム内のpHを、他の調節因子であるプロトンポンプやNa-H交換体などとともにどのように協調して制御しているかは、プロトンシグナル一般を理解する上でも重要な課題であろう。またファゴソーム膜の膜電位計測はこれまでなされた例はなく、今後ファゴソーム膜に特異的に電位感受性色素をターゲットさせるなどの新たな技術が必要になるだろう。更に、ファゴソームに実際に電位依存性プロトンチャンネル分子が存在するかどうか、また、オキシダーゼと超分子的に複合体を作るかどうかを生化学的、免疫組織学的にも検証する必要がある。

更にVSOPはかなり多種の免疫細胞に発現しており、細胞種ごとの生理機能の違いとVSOP分子の関係も興味深い課題である。例えば、樹状細胞では、異物を消化する際に完全に消化せずペプチドとして残して抗原提示を行うので、消化の機構はマクロファージや好中球と異なるはずであるが、最近マクロファージと樹状細胞ではファゴソーム内のpH制御が異なることが報告されている<sup>11)</sup>。VSOPは免疫機構全体の仕組みの中でこうした細胞ごとの役割と機構の違いに対応した微妙なチューニングに効いているのかも知れない。実際、VSOPはウニ、ホヤからヒトまでのゲノム中にみつかると、ショウジョウバエや線虫、粘菌のゲノムなどには見られない(未発表データ)。後者の生物でも貪食機能は有しているもので、VSOPは貪食機能の基本的構成成分というよりは修飾する因子と考えるのが自然かもしれない。最後に、近年gp91phox以外の種類のNADPHオキシダーゼが発見されており、これらが発現している血管内皮細胞などの細胞でもVSOPが機能しているかどうかなども今後の重要な問題であろう。

我々は、神経シグナルに関わる電位依存性チャンネルの研究から発して期せずして免疫機能に関わるイオンチャンネル分子に行きあたった。これまで神経系機能に特殊と考えられてきた電位依存性チャンネルに類似の分子構造をもつタンパク質が免疫系細胞で機能しているという知見は大きな驚きであった。このような電位センサードメインという分子

原理が、哺乳類で最も洗練されている生体システムである免疫系と神経系に共通に使われていることは大変興味深い。

## 謝辞

本稿に貴重なご意見をいただいた鈴木和男先生（国立感染症研究所）、久野みゆき先生（大阪市立大学）に深く感謝致します。また本内容で紹介した著者らの研究に参加した高木正浩氏（生理学研究所技術課）をはじめ、ラボのメンバーに感謝します。

## 文献

- 1) Suzuki, K., Yamada, M., Akashi, K., & Fujikura, T. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 167-173.
- 2) 住本英樹 (2005) 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 302-309.
- 3) 住本英樹 (印刷中) 活性酸素産生の活性化の分子機構, 「生体防御医学事典」.
- 4) Henderson, L.M., Chappell, J.B., & Jones, O.T.G. (1987) *Biochem. J.*, **246**, 325.
- 5) Okamura, Y. (in press) *Pflugers Archiv*.
- 6) Banfi, B., Schrenzel, J., Nusse, O., Lew, D.P., Ligeti, E., Krause, K-H., Demareux, N., et al. (1999) *J. Exp. Med.*, **190**, 183-194.
- 7) Decousey, T., Morgan, D., & Cherny, V.V. (2003) *Nature*, **422**, 531-534.
- 8) Touret, N. & Grinstein, S. (2002) *J. General. Physiol.*, **120**, 767-771.
- 9) Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., & Okamura, Y. (2005) *Nature*, **435**, 1239-1243.
- 10) Sasaki, M., Takagi, M., Okamura, Y. (2006) *Science*, **312**, 589-592.
- 11) Savina, A., et al. (2006). *Cell*, **126**, 205-218.

岡村 康司<sup>1,2,3)</sup>, 佐々木 真理<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンス

センター神経分化研究部門, <sup>2)</sup>生理学研究所,

<sup>3)</sup>総合研究大学院大学生命科学科生理科学専攻)

Phagocytosis and membrane potential

Yasushi Okamura and Mari Sasaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute for Physiological Science, National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5-1, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan)

## 転写因子が DNA 複製開始点の位置を決める

### 1. はじめに

DNA 複製の研究分野は歴史が古く、ワトソンとクリックの DNA の二重らせん構造の発見に始まる。約半世紀にわたり、DNA がどのように複製するのか、そのメカニズムは突き詰められてきた。当初は原核生物である大腸菌の小さな染色体をモデルとして解析が進められてきた。この大腸菌の研究により、次のような DNA 複製に必要な基本因子が同定された。

1. DNA 複製の開始反応を規定する染色体上のシエメント：レプリケーター（多くの場合レプリケーターは複製が始まる複製開始点と一致する。）
2. DNA 複製の開始を制御するトランス活性化因子：イニシエーター
3. DNA 複製を実際に行う DNA 複製装置

次に研究者が目指したものはヒトなどの哺乳類をはじめとする高等真核生物の染色体 DNA 複製である。大腸菌で得られた複製の基本概念は高等真核細胞に適用できるものであった。しかし当然のことながら真核細胞は大腸菌に比べ、より複雑な複製システムをもち、その解明には多くの時間を要し、未だに不明な点も多い。本小文では真核細胞における染色体複製開始制御の理解の現状を簡単に紹介したい。

### 2. DNA 腫瘍ウイルスゲノムの複製<sup>1)</sup>

SV40, ポリオーマウイルスなどは、5kb 前後の小さな二本鎖環状 DNA を染色体として有している。この DNA 腫瘍ウイルスを DNA 複製の研究対象にする利点は、ゲノムがコードする大型 T 抗原 (LT) 以外は宿主細胞由来の DNA 複製装置を利用することであった。また複製開始点についても、DNA 腫瘍ウイルスゲノムの場合、非常にコンパクトであり扱いやすい。

試験管内複製系の開発により、ウイルスの複製に必要な宿主側のコンポーネントが次々に同定され、複製フォークの詳細なモデルが提唱された。また、複製開始の機構についても詳細な解析がなされた。しかし、ウイルスの複製開始点、イニシエーターともにウイルス独自のもので細胞の